

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Katedra analytické chemie

Voltametrické stanovení chloramfenikolu
na borem dopované diamantové filmové elektrodě

Voltammetric Determination of
Chloramphenicol at Boron Doped Diamond Film Electrode

Bakalářská práce
studijního programu Klinická a toxikologická analýza

Tato bakalářská práce vznikla v souvislosti s řešením výzkumného záměru MSM0021620857 a centra základního výzkumu LC 06035.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně, pod vedením školitele RNDr. Jana Fischera, Ph.D. a že jsem všechny použité prameny řádně citovala.

Jsem si vědoma toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu v Praze je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne 1. května 2009.

.....
podpis

Předmětová hesla: chloramfenikol

voltametrie

borem dopovaná diamantová filmová elektroda

Klíčová slova: DC voltametrie

diferenční pulzní voltametrie

cyklická voltametrie

Úvodem bych chtěla poděkovat svému školiteli RNDr. Janu Fischerovi, Ph.D. a všem členům Katedry analytické chemie za odborné vedení, všestrannou pomoc a cenné připomínky k mé práci.

Obsah

1. Úvod	7
1.1 Cíl práce	7
1.2 Studovaná látka	8
1.3 Metody stanovení chloramfenikolu	9
1.4 Použitá metoda	9
2. Experimentální část	12
2.1 Reagencie	12
2.2 Aparatura	12
2.3 Pracovní postupy	14
2.4 Stálost zásobního roztoku chloramfenikolu	14
3. Výsledky a diskuse	17
3.1 DC voltametrie	17
3.2 Diferenční pulzní voltametrie	21
3.3 Cyklická voltametrie	25
4. Závěr	27
5. Literatura	28

Seznam použitých zkratk a symbolů

A	absorbance
BDDFE	borem dopovaná diamantová filmová elektroda
BR pufr	Brittonův-Robinsonův pufr
c	molární koncentrace [mol.l^{-1}]
CAP	chloramfenikol
C.A.S.	Chemical Abstract Service
CV	cyklická voltametrie
DCV	DC voltametrie
DPV	diferenční pulzní voltametrie
E_p	potenciál píku nebo vlny [mV]
I_p	proud píku nebo vlny [nA]
LOD	mez stanovitelnosti [mol.l^{-1}]
p_a	anodický pík
pH	záporný dekadický logaritmus koncentrace oxoniových iontů
p_k	katodický pík
t	čas [s]
λ_{max}	vlnová délka absorpčního maxima [nm]

1. Úvod

1.1 Cíl práce

Cílem této práce bylo nalézt optimální podmínky pro stanovení chloramfenikolu na borem dopované diamantové filmové elektrodě technikou DC voltametrie a diferenční pulzní voltametrie s co nejnižší mezí stanovitelnosti.

1.2 Studovaná látka

Systematický název: 2,2-dichlor-N-[(1R, 2R)-2-hydroxy-1-(hydroxymethyl)-2-(4-nitrofenyl)ethyl]acetamid

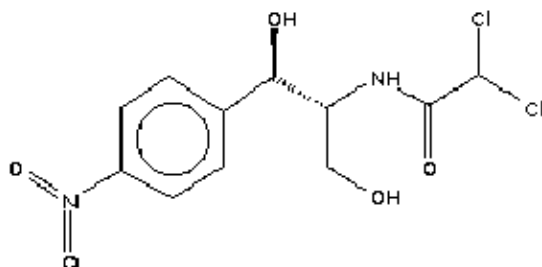
CAS Name: Chloramphenicol

Sumární vzorec: $C_{11}H_{12}Cl_2N_2O_5$

Relativní molekulová hmotnost: 323.12

CAS registrační číslo: 56-75-7

Strukturní vzorec:



Další názvy:

Acetamide, Alficetyn; Amphenicol; Austracol; Chemicetin; Chloramex; Chlorocid; Chloromycetin; Chloronitrin; Cidocetine; Cloramficin; Cloramicol; Fenicol; Leukomycin; Levomicetina; Loromisin; Mastiphen; Mycinol; Novomycetin; Ophthochlor; Parafin ¹

1.3 Vlastnosti a biologické účinky chloramfenikolu

Chloramfenikol (CAP) je bílý, nažloutle bílý nebo nažloutle bílý jemný krystalický prášek nebo jemné krystalky. Je těžce rozpustný ve vodě, snadno rozpustný v 96% ethanolu a v propylenglykolu. ²

CAP patří do skupiny amfenikolových antibiotik. ³ Je to širokospektrální antibiotikum, působící proti gram-pozitivním a gram-negativním mikroorganismům.

Byl izolován v roce 1947 ze *Streptomyces venezulae* Davidem Gottliebem a je běžně používán k léčbě závažných infekcí, jako například břišního tyfu, dalších forem salmonelózy a dětské meningitidy. ⁴ Působí proti *Nisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* a *Enterococcus faecium*. Chloramfenikol je mimořádně rozpustný v lipidech, proto účinně proniká do všech tkání v těle, včetně mozku. Má bakteriostatický účinek. Zastavuje růst bakterií tím, že inhibuje syntézu jejich proteinů. ⁵

Vzhledem k nízkým nákladům na výrobu a vysoké účinnosti je také hojně používán v živočišné výrobě a je široce využíván ve veterinární praxi jako doplňková látka pro podporu růstu. Nicméně to, že je relativně vysoká úroveň rezidua antibiotika v potravinách může vyvolávat alergické reakce u některých přecitlivělých jedinců a může ohrozit lidský imunitní systém.⁶ Nedávný výzkum ukázal, že CAP má toxické nežádoucí účinky na krvetvorný systém. Nejčastějším účinkem je aplastická anémie (neschopnost kostní dřeně produkovat krvinky). Proto jsou dnes jeho klinické aplikace omezeny. Pro použití v potravinách živočišného původu byl zakázán na území celé Evropské unie a Spojených států Amerických.⁷ Avšak v rozvojových zemích je stále velmi široce používán.⁵

Dnes je CAP předepisován v širokém rozsahu především ve formě očních kapek nebo mastí k léčbě konjunktivitid (zánětu spojivek). Aplikace ve formě tablet nebo injekcí s sebou nese riziko aplastické anémie. Působí tlumivě na krvetvorbu a snižuje tvorbu protilátek, proto by se měl užívat pouze k léčbě nejtěžších infekcí, které jsou rezistentní vůči bezpečnějším typům antibiotik.⁸

1.4 Metody stanovení Chloramfenikolu

Pro stanovení CAP v různých biologických materiálech bylo vyvinuto několik technik.

Může být stanoven pomocí UV spektrometrie⁹, HPLC⁷, tenkovrstvé chromatografie¹⁰, imunochemickými metodami,¹¹ kapilární zónové elektroforézy s amperometrickou detekcí.¹² Nicméně tyto metody jsou často komplikované a časově a finančně náročné.⁶

Elektrochemické vlastnosti CAP byly již studovány. Chloramfenikol byl stanoven diferenční pulsní polarografií, kde pro jeho stanovení použili acetátový pufr (pH 4,6), kde měl limit detekce asi $2 \cdot 10^{-8} \text{ mol.l}^{-1}$ (cit.¹³) a DP voltametrií s elektrodou ze skelného uhlíku ve fosfátovém pufru (pH 7,0), kde měl detekční limit asi $5 \cdot 10^{-9} \text{ mol.l}^{-1}$. (cit.¹⁴) CAP byl také zkoumán square-wave polarografií, kde byl detekční limit $10^{-8} \text{ mol.l}^{-1}$. (cit.¹⁵) CAP byl už na borem dopovaných elektrodách studován cyklickou voltametrií. U této metody byl nejvyšší signál CAP získán s fosfátovým pufrem (pH 6) v 1% etanolu a limit detekce $3 \cdot 10^{-8} \text{ mol.l}^{-1}$. Tato metoda byla použita ke stanovení chloramfenikolu ve sterilních očních kapkách, vzorku mléka.¹⁶

1.5 Použitá metoda

Jak již bylo zmíněno CAP může být stanoven mnoha metodami, které jsou citlivější než je voltametrie, avšak tyto metody často jsou poměrně drahé, instrumentálně náročné a časově náročné. Elektroanalytické metody jsou levné, dostatečně citlivé a selektivní pro stanovení

CAP v léčivech, kde je jeho koncentrace $1 \cdot 10^{-1} \text{ mol.l}^{-1}$. Představují nezávislou alternativu k dosud převládajícím spektrometrickým a dělicím technikám.¹⁷ Jsou tedy vhodné pro rozsáhlé sledování různých genotoxických látek.¹⁸ Cyklická voltametrie má hlavní význam pro studium elektrodových reakcí. Z průběhu katodických a anodických křivek lze posoudit mechanismus reakcí na elektrodě a na jakou sloučeninu se asi daná látka oxiduje nebo redukuje. U DC voltametrie se sleduje průběh naměřených vln a to zejména jejich charakteristické vlastnosti proud – určuje kvantitu látky a půlvlnový potenciál – kvalitativní charakteristika látky. Vyvinutí pulzních metod v elektroanalytické chemii bylo motivováno zlepšením analytického signálu, tedy zvýšením poměru signál /šum. Tento zvýšený poměr se projeví v nižších limitech detekce. Jako pracovní elektrody se ve voltametii asi nejvíce využívají rtuťové kapkové elektrody.¹⁹ Avšak s ohledem na přísná ekologická a bezpečnostní pravidla, která komplikují používání rtuti, existuje tendence nahradit ji jinými nejedovatými materiály.²⁰ Dále se používají elektrody ze skelného uhlíku,²¹ tuhé amalgamové stříbrné elektrody,²² uhlíkové pastové elektrody²³ a námi používaná borem dopovaná diamantová elektroda.¹⁸

Diamant představuje svými vynikajícími vlastnostmi materiál atraktivní pro mnoho aplikací jako elektronická zařízení, vysokoteplotní čidla, biomedicínské aplikace a pro přípravu velmi stabilní elektrody pro elektrochemii,^{24,25,26} je také jeden z nejlepších izolantů, ale při jeho dopování borem můžeme upravovat jeho elektronické vlastnosti v závislosti na dopované úrovni.²⁷

První práce zabývající se využitím polovodivých diamantových elektrod v elektrochemii byla publikována v roce 1987.²⁸ Asi nejčastěji jsou využívány borem dopované diamantové elektrody ve formě polykrystalických filmů, které se připravují metodou chemické depozice par (CVD). Jako zdroje energie se zde využívá žhavených vláken nebo mikrovlnného ohřevu. Do reaktoru je přiváděna směs methanu, vodíku a diboranu. Methan slouží jako zdroj uhlíku k růstu diamantu, vodík jako redukční prostředí a diboran jako zdroj boru pro dopaci diamantu. Nosičem jsou zde křemíkové destičky. Tyto destičky mají nízký odpor a jsou zabroušeny diamantovým prachem – částičky tohoto prachu slouží poté jako krystalizační centra. Během výroby se mohou upravovat některé parametry jako například teplota, tlak, rychlost průtoku plynů nebo doba růstu diamantu. Podle těchto parametrů můžeme připravit BDDFE v různých formách – od mikrokrytalické až po ultrananokrytalickou. Tyto formy se liší tloušťkou vrstvy a velikostí zrn.^{29,30}

Borem dopované diamantové elektrody se hodně využívají pro své výborné elektrochemické vlastnosti jako například široké potenciálové okno, nízká kapacita elektrické

dvojvrstvy,^{25,31,32} jejímž důsledkem je nízký zbytkový proud a velmi malý šum.³³ Mezi další vlastnosti patří nízká adsorpce polárních organických molekul, vysoká odolnost k deaktivaci,^{26,27} snadné čištění povrchu ve srovnání s jinými elektrodoými povrchy, vysoká citlivost, chemická netečnost, bezpečnější provozní podmínky.^{17, 18, 30}

Výběr elektrody závisí také na tom, jestli má stanovovaná látka elektrochemicky redukovatelnou nebo oxidovatelnou funkční skupinu. Borem dopovaná diamantová elektroda je však vhodná pro oba druhy stanovovaných látek. Námi stanovovaná látka chloramfenikol obsahuje snadno redukovatelnou funkční skupinu – NO₂. Při stanovení CAP dochází nejprve ke čtyřelektronové redukci nitroskupiny na hydroxylaminovou skupinu, která je pak zpětně oxidovatelná až při vyšších kladných potenciálech na nitroso skupinu.³⁴

2. Experimentální část

2.1 Reagencie

Zásobní roztok chloramfenikolu o koncentraci $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol.l}^{-1}$ byl připraven rozpuštěním přesně naváženého množství dané látky (99%, Sigma-Aldrich, Praha, ČR) ve 100 ml destilované vody. Roztoky o nižších molaritách byly připravovány přesným ředěním zásobního roztoku destilovanou vodou. Všechny roztoky byly uchovávány ve tmě za laboratorní teploty.

Další použité chemikálie – kyselina dusičná, kyselina boritá, octová kyselina, kyselina fosforečná, hydroxid sodný, chlorid draselný, hexakynoželesnatan draselný (ferrokyanid) – čistota p.a., Lachema Brno, ČR.

Brittonovy-Robinsonovy (BR) tlumivé roztoky o příslušném pH byly připraveny smíšením $0,2 \text{ mol.l}^{-1}$ NaOH s roztokem obsahujícím kyselinu boritou, fosforečnou a octovou, každou o koncentraci $0,04 \text{ mol.l}^{-1}$

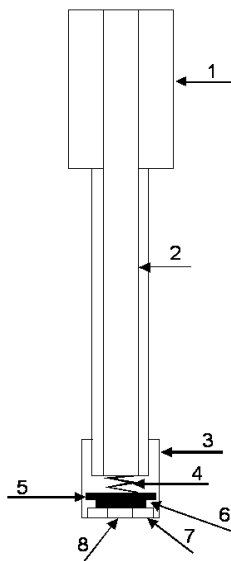
Přesná hodnota pH byla měřena digitálním pH-metrem Jenway 4330 (Jenway, Essen, Velká Británie) s kombinovanou skleněnou elektrodou (typ 924 005). pH-metr byl kalibrován standardními vodnými pufrů za laboratorní teploty.

2.2 Aparatura

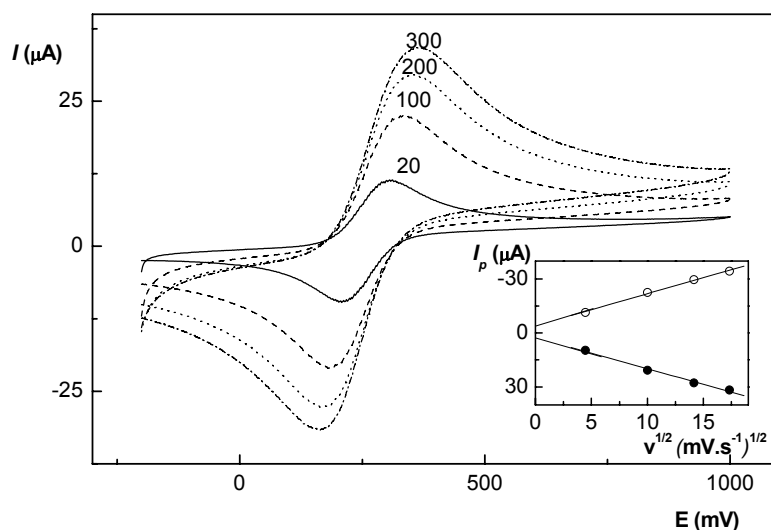
Pro voltametrická měření byla použita sestava Eco-Tribo Polarograf se softwarem PolarPro verze 5.1, firma Polaro-Sensors, Praha, ČR. Software pracoval v operačním systému Windows XP. Jednotlivá měření byla prováděna v tříelektrodovém zapojení, kde byla použita referenční argentchloridová elektroda (3 mol.l^{-1} KCl) typu ETP a jako pomocná elektroda platinový drátek typu ETP (obojé Eco Trend Plus, Praha). Jako pracovní elektroda byla použita borem dopovaná diamantová filmová elektroda (BDDFE) v diskovém uspořádání (viz obr. 2.1) o průměru 4 mm. Při cyklické a DC voltametii byla rychlost nárůstu potenciálu 20 mV.s^{-1} . Potenciálový rozsah byl při cyklické voltametii od -1770 do 1550 mV . Při DPV byly na elektrodu vkládány pulsy o šířce 100 ms a modulační amplitudě -50 mV , rychlost nárůstu potenciálu byla 20 mV.s^{-1} .

Spektrofotometrická měření byla prováděna na přístroji Agilent 8453 (Agilent, USA) v křemenných kyvetách měrné tloušťky 1 cm.

Pracovní BDDFE byla testována redoxním systémem ferrokyanid/ferrikyanid draselný tak, že byly naměřeny cyklické voltamogramy $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol.l}^{-1}$ ferrokyanidu draselného v 1 mol.l^{-1} chloridu draselném při různých rychlostech polarizace (viz obr. 2.2). Velikosti proudů píků byly vyneseny proti druhé odmocnině z rychlosti polarizace a byla zjištěna lineární závislost. To vypovídá o ději kontrolovaném difúzí.



Obr. 2.1 Schéma BDDFE v diskovém uspořádání. Teflonové tělo (1), elektrický kontakt (2), šroubovací nástavec (3), kovová pružina (4), mosazná lamela (5), BDDFE na křemíkové podložce (6), těsnění z vitonu (7), ústí elektrody – kontakt s roztokem (8).³⁵



Obr. 2.2 Cyklické voltamogramy $1.10^{-3} \text{ mol.l}^{-1} \text{ K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ v $1 \text{ mol.l}^{-1} \text{ KCl}$ při různých rychlostech polarizace. Na vloženém grafu je znázorněna lineární závislost proudů píků na odmocnině z rychlosti polarizace. Čísla v grafu odpovídají použitým rychlostem polarizace v mV.s^{-1} .

2.3 Pracovní postupy

2.3.1 Voltametrie

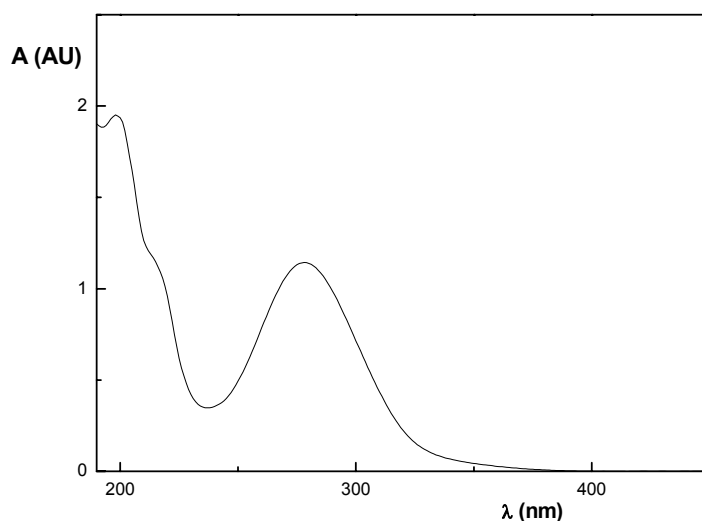
BDDFE se nejdříve aktivovala cyklickou voltametrií v kyselině dusičné o koncentraci 1 mol.l^{-1} ve 20 cyklech v potenciálovém rozsahu od -2500 do 2500 mV a rychlosti nárůstu potenciálu 100 mV.s^{-1} . Elektroda byla pravidelně kontrolována cyklickou voltametrií, kdy byla sledována reverzibilita redoxního systému ferrokyanid/ferrokyanid. Cyklické voltamogramy byly měřeny v roztoku ferrokyanidu draselného o koncentraci $1.10^{-3} \text{ mol.l}^{-1}$ v 1 mol.l^{-1} chloridu draselném v potenciálovém rozsahu od -200 do 1000 mV .

Při voltametrických měřeních bylo do polarografické nádoby odpipetováno příslušné množství roztoku chloramfenikolu ve vodě, a pak byl roztok doplněn BR pufrem o příslušném pH do objemu 10 ml . Takto připravený roztok byl probubláván dusíkem po dobu 15 s . Poté byl proveden záznam voltametrické křivky. Před každým dalším záznamem byl roztok 15 s probubláván. Všechny křivky byly měřeny třikrát a poté statisticky vyhodnoceny. Mezi měřeními odlišných vzorků byla elektroda opláchnuta destilovanou vodou. Veškerá měření byla prováděna za laboratorní teploty. U DC voltametrie byl půlvlnový potenciál odečten v polovině naměřené vlny a proud byl při tomto potenciálu odečten mezi tečnami ke křivce před a za vlnou. Při DP voltametrii byl potenciál odečten v lokálním maximu píku a proud byl

odečten od spojnice minim po stranách píku. Meze stanovitelnosti byly vyhodnoceny pomocí výpočtu programem ADSTAT, který ji počítá jako nejmenší hodnotu signálu, pro kterou je relativní směrodatná odchylka predikce z kalibračního grafu dostatečně malá a rovná číslu 0,1. (cit. ³⁶)

2.4 Stálost zásobních roztoků

Stálost zásobního roztoku CAP o koncentraci $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol.l}^{-1}$ v destilované vodě byla po zředění destilovanou vodou na koncentraci $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$ sledována spektrofotometricky v křemenných kyvetách o měrné tloušťce 1,0 cm. Referentní kyveta byla naplněna destilovanou vodou. Absorbance zásobního roztoku byla měřena při vlnové délce $\lambda_{\text{max}} = 278 \text{ nm}$, při které studovaná látka vykazovala absorpční maximum. Absorpční spektrum studované látky je uvedeno na obr. 2.4. Výsledky měření stálosti zásobního roztoku jsou shrnuty v tab. 2.2. Ze spektrofotometrického studia stálosti zásobního roztoku CAP uchovávaného za nepřístupu světla při laboratorní teplotě vyplývá, že CAP je po dobu více než měsíce stabilní.



Obr. 2.4 Absorpční spektrum roztoku ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$) ve vodě. Měřeno v křemenných kyvetách o měrné tloušťce 1 cm.

Tab. 2.2 *Spektrofotometrické studium stálosti zásobního roztoku CAP o koncentraci $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$ sledované při vlnové délce $\lambda_{\text{max}} = 278 \text{ nm}$. Číselné hodnoty udávají relativní hodnotu absorbance v % proti hodnotě absorbance čerstvě připraveného roztoku.*

<i>Dny</i>	<i>Chloramfenikol</i>	
	<i>A</i>	<i>(%)</i>
1	1,1631	100
4	1,1427	98,25
11	1,1375	97,80
18	1,1345	98,06
34	1,1436	98,33

3. Výsledky a diskuse

3.1 DC Voltametrie

3.1.1 Vliv pH

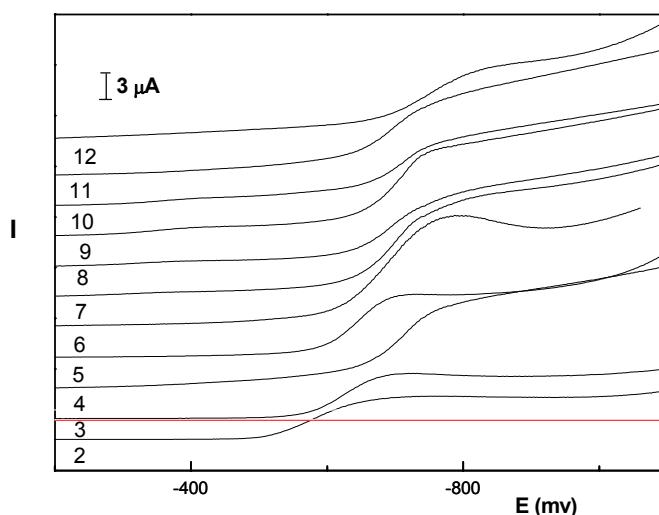
Vliv pH na chování chloramfenikolu ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$) při DCV na BDDFE byl sledován v prostředí BR pufru o pH 2,0 až 12,0. Látka v celé oblasti pH poskytuje jednu vlnu. Půlvalnový potenciál mezi pH 2 – 5 lineárně klesal, v rozmezí pH 6 až do pH 12 se téměř neměnil. Jako optimální bylo zvoleno prostředí BR pufru o pH 6, kde CAP poskytoval nejvyšší signál. Zaznamenané voltametrické křivky ukazuje Obr. 3.1.

Metodou lineární regrese byly pro závislost potenciálu DC voltametrické vlny E_p na pH v rozmezí pH 2,0 – 12,0 vypočteny vztahy:

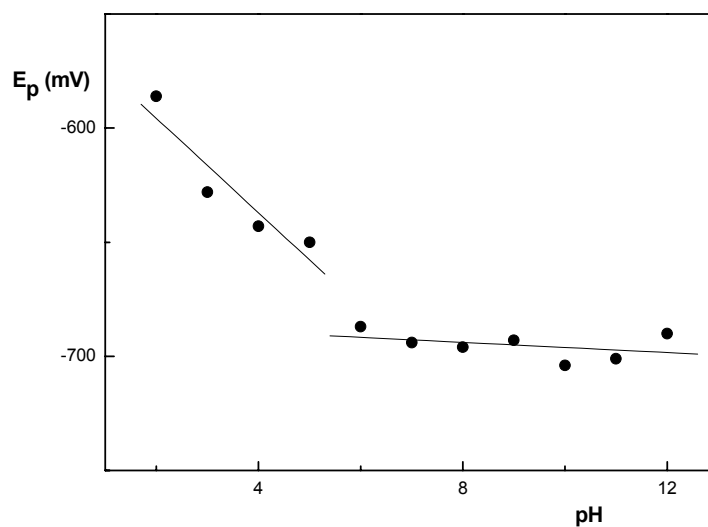
pro pH od 2,0 do 5,0: $E_p [\text{mV}] = -20,70 \text{ pH} - 554,3$ (korelační koeficient 0,9317)

pro pH od 6,0 do 12,0: $E_p [\text{mV}] = -1,107 \text{ pH} - 685,0$ (korelační koeficient 0,4017)

Výšky vln mezi pH 2 – 5 kolísaly mezi hodnotou 4 – 5 μA . Při pH 6 byla výška vlny nejvyšší. Poté se výška pík ustálila na hodnotě od 3,5 – 6 μA , kromě výšky vlny při hodnotě o pH 7. Zjištěné závislosti půlvalnových potenciálů E_p a proudů v polovině vlny I_p na pH roztoku jsou uvedeny v Tab. 5. Graficky je závislost E_p na pH znázorněna na Obr. 3.2.



Obr. 3.1 Voltamogramy CAP ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$) měřené technikou DCV na BDDFE v prostředí BR pufru o pH 2–12. Čísla v grafu odpovídají použitému pH.



Obr. 3.2 Závislost půlvolného potenciálu E_p CAP ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$) na pH roztoku, měřeno technikou DCV na BDDFE v prostředí BR pufru.

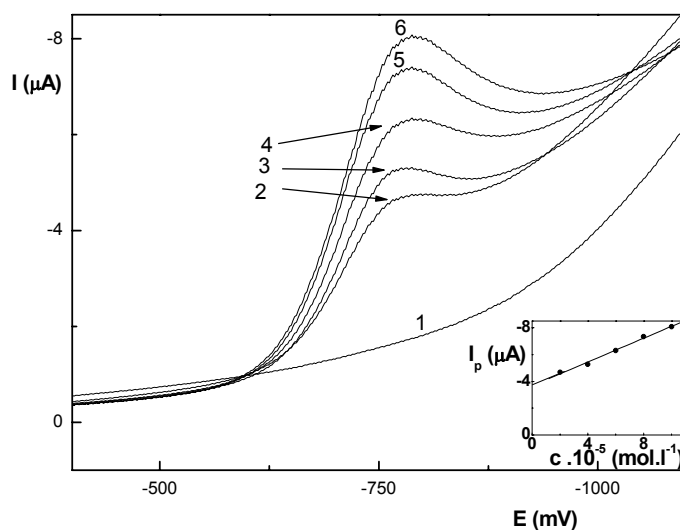
Tab. 3.1 Vliv pH na půlvolné potenciály a proudy v polovině vln CAP ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$) při měření na BDDFE v prostředí BR pufru.

pH	E_p (mV)	I_p (nA)
2.0	-586	-4332
3.0	-628	-4638
4.0	-643	-5776
5.0	-650	-4239
6.0	-687	-11460
7.0	-694	-7382
8.0	-696	-5013
9.0	-693	-6085
10.0	-704	-3669
11.0	-701	-5471
12.0	-690	-4382

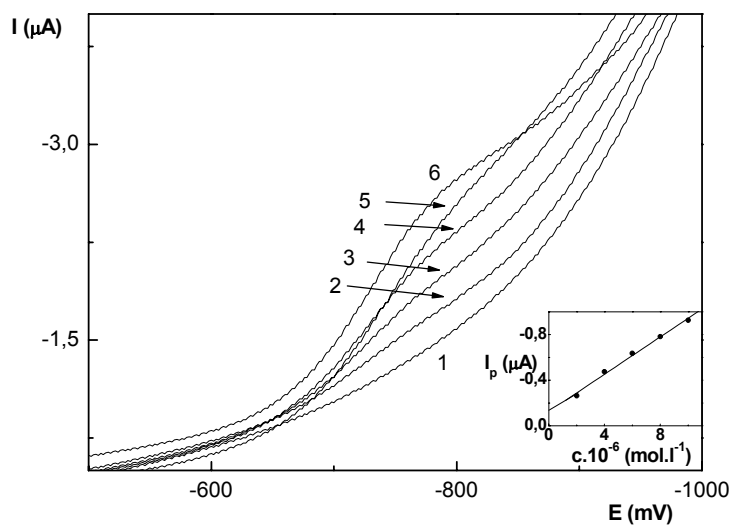
3.1.2 Koncentrační závislost

Koncentrační závislosti CAP byly proměřeny koncentračním rozmezí $1 \cdot 10^{-4} - 2 \cdot 10^{-6} \text{ mol.l}^{-1}$ metodou DCV na BDDFE v prostředí BR pufru o pH 6, kde CAP poskytoval nejvyšší signál.

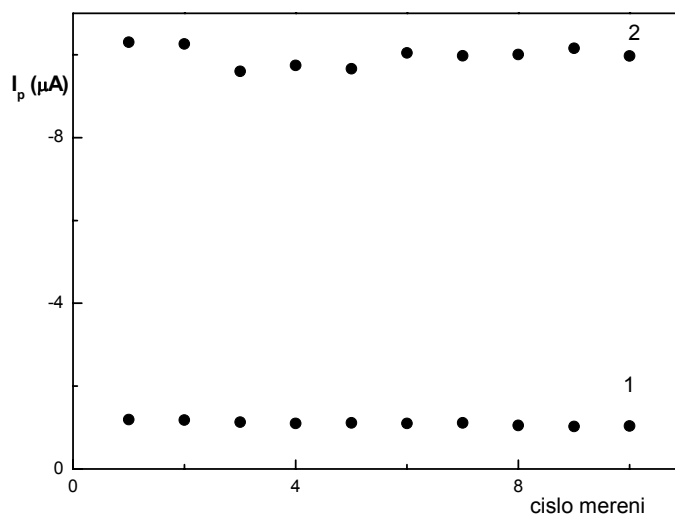
Závislost výšky DC voltmetrické vlny na koncentraci v oblasti koncentrace CAP od $1 \cdot 10^{-4}$ do $2 \cdot 10^{-5} \text{ mol.l}^{-1}$ a od $1 \cdot 10^{-5}$ do $2 \cdot 10^{-6} \text{ mol.l}^{-1}$ je lineární, ale směrnice koncentračních řádů se významně liší. To může být dáno saturací povrchu elektrody analytem, což odpovídá i velkému úseku vyššího koncentračního rozsahu. Parametry kalibračních přímek a meze stanovitelnosti jsou uvedeny v Tab. 3.2. Na Obr. 3.3 jsou zobrazeny DC voltamogramy CAP v koncentračním rozmezí $(2 - 10) \cdot 10^{-5} \text{ mol.l}^{-1}$ a na Obr. 3.4 jsou zobrazeny DC voltamogramy v koncentračním rozmezí $(2 - 10) \cdot 10^{-6} \text{ mol.l}^{-1}$. Na Obr. 3.5 je zobrazena závislost proudu DC voltmetrické vlny na počtu měření při koncentracích CAP $5 \cdot 10^{-6} \text{ mol.l}^{-1}$ a $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$, ze které vyplývá, že nedochází při měření k pasivaci elektrody. Pro CAP bylo dosaženo meze stanovitelnosti $3 \cdot 10^{-6} \text{ mol.l}^{-1}$.



Obr. 3.3 Voltamogramy CAP měřené technikou DCV na BDDFE v prostředí BR pufru o pH 6. $c(\text{CAP})$: (1) 0; (2) $2 \cdot 10^{-5}$; (3) $4 \cdot 10^{-5}$; (4) $6 \cdot 10^{-5}$; (5) $8 \cdot 10^{-5}$; (6) $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$. Na vloženém grafu je znázorněna závislost proudu píku I_p na koncentraci v rozmezí $(2 - 10) \cdot 10^{-5} \text{ mol.l}^{-1}$.



Obr. 3.4 Voltamogramy CAP měřené technikou DCV na BDDFE v prostředí BR pufru o pH 6. $c(\text{CAP})$: (1) 0; (2) $2 \cdot 10^{-6}$; (3) $4 \cdot 10^{-6}$; (4) $6 \cdot 10^{-6}$; $8 \cdot 10^{-6}$; (5) $1 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$. Na vloženém grafu je znázorněna závislost proudu píku I_p na koncentraci v rozmezí $(2 - 10) \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$.



Obr. 3.5 Závislost proudu píku I_p na počtu měření. Koncentrace CAP byla $5 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ (1) a $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ (2). Měřeno technikou DCV na BDDFE v prostředí BR pufru o pH 6.

Tab. 3.2 Parametry kalibračních přímek pro stanovení CAP metodou DCV na BDDFE v prostředí BR pufru o pH 6.

Koncentrace [mol.l⁻¹]	Směrnice [nA.mol⁻¹.l]	Úsek [nA]	Koef. korelace	LOD [mol.l⁻¹]
(2 – 10) .10 ⁻⁵	-4.43.10 ⁷	-3680	0.9962	-
(2 – 10) .10 ⁻⁶	-8,19.10 ⁷	-124,8	0.9968	3.10 ⁻⁶

3.2 DP Voltametrie

3.2.1 Vliv pH

Vliv pH na chování CAP ($c = 1.10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$) při DPV na BDDFE byl sledován v prostředí BR pufru o pH 2,0 až 12,0. Látka v celé oblasti pH poskytuje jeden pík. Potenciál DP píku byl mezi pH 2 – 3 konstantní, poté od pH 3 do pH 5 potenciál klesal a od pH 6 až do pH 12 už se téměř neměnil. Jako optimální bylo zvoleno prostředí BR pufru o pH 6. Zaznamenané DP voltametrické křivky ukazuje Obr. 3.6

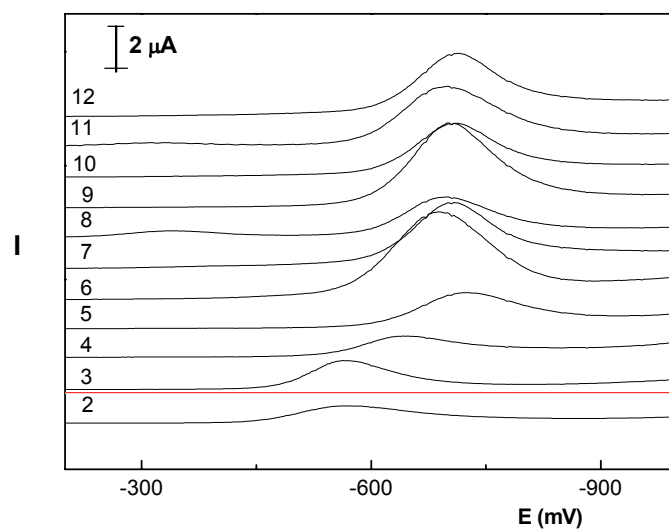
Metodou lineární regrese byly pro závislost potenciálu DC voltametrického píku E_p na pH v rozmezí pH 2,0- 12,0 vypočteny vztahy:

pro pH od 3,0 do 5,0: $E_p [\text{mV}] = -79,5 \text{ pH} - 324$ (korelační koeficient 0,9995)

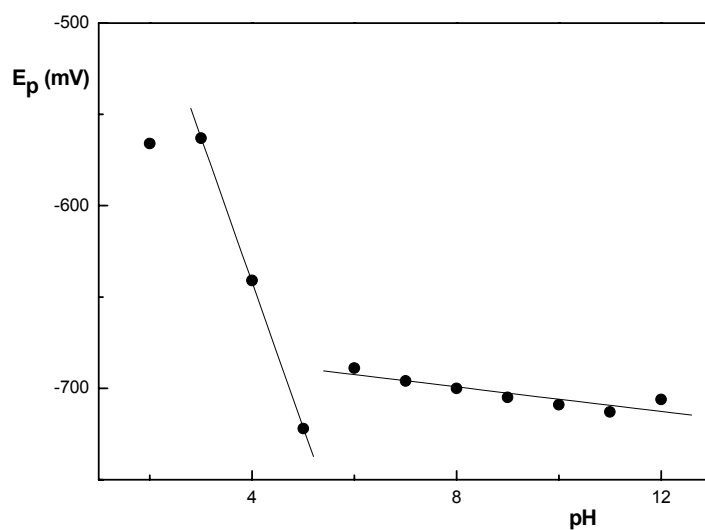
pro pH od 6,0 do 12,0: $E_p [\text{mV}] = -3,36 \text{ pH} - 672$ (korelační koeficient 0,8860)

Výšky píků mezi pH 2 – 5 kolísaly mezi hodnotou 1 – 2 μA . Při pH 6 byla výška píku nejvyšší. Pro vyšší pH se výška píků ustálila na hodnotě od 3 – 4 μA , kromě výšky píku při hodnotě o pH 9, kdy byl proud píků vyšší.

Zjištěné závislosti potenciálu píku E_p a proudu píku I_p na pH roztoku jsou uvedeny v Tab. 3.3. Graficky je závislost E_p na pH znázorněna na Obr. 3.7.



Obr. 3.6 Voltamogramy CAP ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$) měřené technikou DPV na BDDFE v prostředí BR pufru o pH 2–12. Čísla uvedená v grafu odpovídají pH.



Obr. 3.7 Závislost potenciálu píku E_p CAP ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$) na pH roztoku, měřeno technikou DPV na BDDFE v prostředí BR pufru.

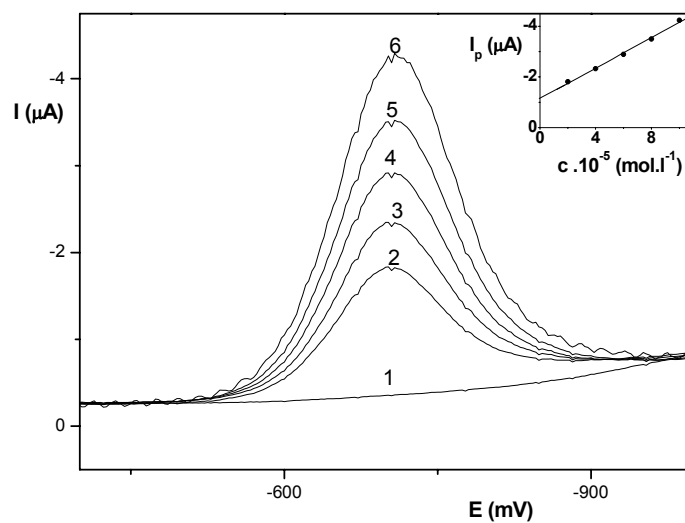
Tab. 3.3 Vliv *pH* na DP voltamogramy CAP ($c=1.10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$) při měření na BDDFE v prostředí BR pufru.

<i>pH</i>	$E_p [\text{mV}]$	$I_p [\text{nA}]$
2.0	-566	-1008
3.0	-563	-1748
4.0	-641	-1085
5.0	-722	-1930
6.0	-689	-5631
7.0	-696	-3517
8.0	-700	-3310
9.0	-705	-5087
10.0	-709	-3070
11.0	-713	-3576
12.0	-706	-3682

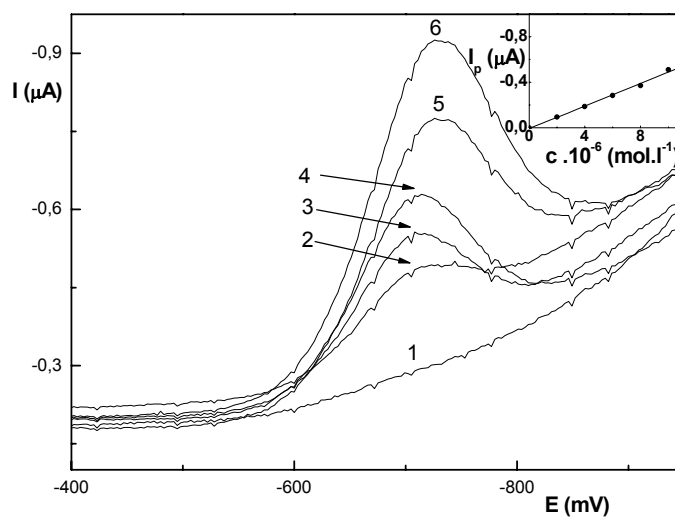
3.2.2 Koncentrační závislost

Koncentrační závislosti CAP byly proměřeny v koncentračním rozmezí $1.10^{-4} - 2.10^{-6} \text{ mol.l}^{-1}$ metodou DPV na BDDFE v prostředí BR pufru o *pH* 6, kde poskytoval nejvyšší signál.

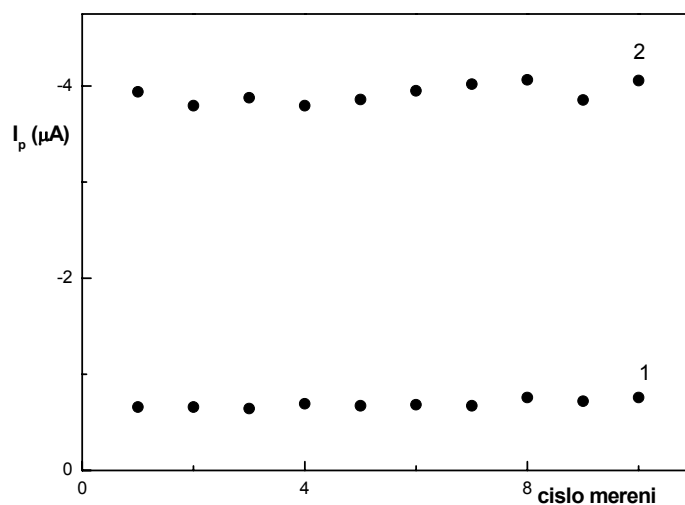
Závislost výšky píku na koncentraci v oblastech koncentrace od 1.10^{-4} do $2.10^{-5} \text{ mol.l}^{-1}$ a od 1.10^{-5} do $2.10^{-6} \text{ mol.l}^{-1}$ je lineární, ale směrnice koncentračních řádů se významně liší. To může být dáno saturací povrchu elektrody analytem, což odpovídá i velkému úseku vyššího koncentračního rozsahu. Parametry kalibračních přímek a mez stanovitelnosti jsou uvedeny v Tab. 3.4. Na Obr. 3.8 jsou zobrazeny DP voltamogramy chloramfenikolu v koncentračním rozmezí $(2 - 10) \cdot 10^{-5} \text{ mol.l}^{-1}$ a na obr. 3.9 jsou zobrazeny DP voltamogramy chloramfenikolu v koncentračním rozmezí $(2 - 10) \cdot 10^{-6} \text{ mol.l}^{-1}$. Na Obr. 3.10 je zobrazena závislost proudu píku na počtu měření při koncentracích CAP $2.10^{-6} \text{ mol.l}^{-1}$ a $1.10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$, ze které vyplývá, že nedochází při měření k pasivaci elektrody. Pro CAP bylo dosaženo meze stanovitelnosti $3.10^{-6} \text{ mol.l}^{-1}$.



Obr. 3.8 Voltamogramy CAP měřené technikou DPV na BDDFE v prostředí BR pufru o pH 6. $c(\text{CAP})$: (1) 0; (2) $2 \cdot 10^{-5}$; (3) $4 \cdot 10^{-5}$; (4) $6 \cdot 10^{-5}$; (5) $8 \cdot 10^{-5}$; (6) $1 \cdot 10^{-6} \text{ mol.l}^{-1}$. Na vloženém grafu je znázorněna závislost proudu píku I_p na koncentraci v rozmezí $(2 - 10) \cdot 10^{-5} \text{ mol.l}^{-1}$.



Obr. 3.9 Voltamogramy CAP měřené technikou DPV na BDDFE v prostředí BR pufru o pH 6. $c(\text{CAP})$: (1) 0; (2) $2 \cdot 10^{-6}$; (3) $4 \cdot 10^{-6}$; (4) $6 \cdot 10^{-6}$; (5) $8 \cdot 10^{-6}$; (6) $1 \cdot 10^{-5} \text{ mol.l}^{-1}$. Na vloženém grafu je znázorněna závislost proudu píku I_p na koncentraci v rozmezí $(2 - 10) \cdot 10^{-6} \text{ mol.l}^{-1}$.



Obr. 3.10 Závislost proudu píku I_p na počtu měření. Koncentrace CAP byla $2 \cdot 10^{-6} \text{ mol.l}^{-1}$ (1) a $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$ (2). Měřeno technikou DPV na BDDFE v prostředí BR pufru o pH 6.

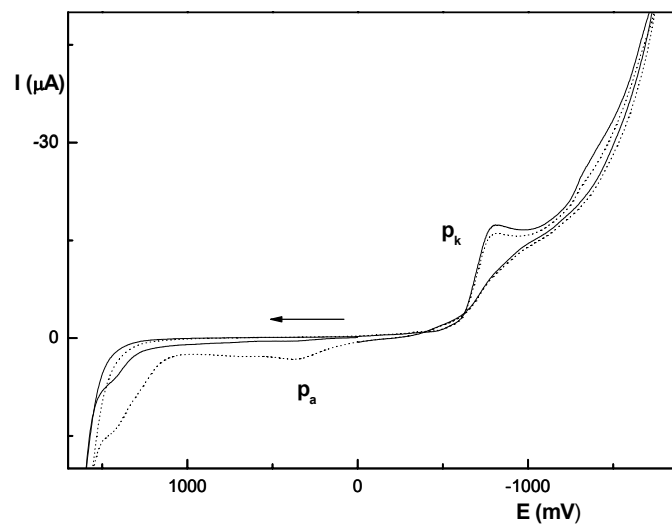
Tab. 3.4 Parametry kalibračních přímek pro stanovení CAP metodou DCV na BDDFE v prostředí BR pufru o pH 6.

Koncentrace [mol.l ⁻¹]	Směrnice [nA.mol ⁻¹ .l]	Úsek [nA]	Koef. korelace	LOD [mol.l ⁻¹]
$(2 - 10) \cdot 10^{-5}$	$-3.02 \cdot 10^7$	-1140	0.9977	-
$(2 - 10) \cdot 10^{-6}$	$-5.43 \cdot 10^7$	-346	0.9832	$3 \cdot 10^{-6}$

3.1 Cyklická voltametrie

V roztoku CAP o koncentraci $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$ v prostředí BR pufru o pH 6 byly měřeny tři cykly od 0 mV v potenciálovém rozsahu od 1550 do -1770 mV. Při prvním cyklu se objevil jeden pík při potenciálu -780 mV. Při druhém cyklu se objevily dva píky při $p_k = -780 \text{ mV}$ a $p_a = 400 \text{ mV}$. V třetím cyklu se oba píky už jen snížily. Katodický pík při

potenciálu $p_k = -780$ mV odpovídá redukci nitro skupiny na hydroxylaminovou skupinu.¹⁶ Anodický pík při potenciálu $p_a = 400$ mV odpovídá oxidaci hydroxylaminové skupiny na nitroso skupinu. Voltamogramy dvou prvních cyklů jsou znázorněny na Obr. 3.11.



Obr. 3.11 Voltamogram CAP ($c=1 \cdot 10^{-4}$ mol. Γ^{-1}) měřené technikou CV na BDDFE v prostředí BR pufru o pH 6 při obou cyklech. Měřeno ve směru od 0 mV k 1550 mV poté k -1770 mV a k 0 mV. První cyklus- plná čára; druhý cyklus-tečkovaná čára.

4. Závěr

Při stanovení chloramfenikolu pomocí DC voltametrie bylo zjištěno, že látka poskytuje v prostředí BR pufru jednu vlnu. Jako optimální bylo pro stanovení chloramfenikolu zvoleno prostředí BR pufru o pH 6. Závislost výšky DC voltmetrické vlny na koncentraci v oblastech koncentrace chloramfenikolu od $1 \cdot 10^{-4}$ do $2 \cdot 10^{-5} \text{ mol.l}^{-1}$ a od $1 \cdot 10^{-5}$ do $2 \cdot 10^{-6} \text{ mol.l}^{-1}$ jsou lineární. Měření jsou opakovatelná v celém sledovaném koncentračním rozsahu.

Při stanovení chloramfenikolu pomocí diferenční pulzní voltametrie bylo zjištěno, že látka poskytuje v prostředí BR pufru jeden pík. Jako optimální bylo pro stanovení chloramfenikolu zvoleno prostředí BR pufru o pH 6. Závislost výšky píku na koncentraci v oblastech koncentrace chloramfenikolu od $1 \cdot 10^{-4}$ do $2 \cdot 10^{-5} \text{ mol.l}^{-1}$ a od $1 \cdot 10^{-5}$ do $2 \cdot 10^{-6} \text{ mol.l}^{-1}$ jsou lineární. Měření jsou opakovatelná v celém sledovaném koncentračním rozsahu.

Meze stanovitelnosti jsou shrnuty v Tab. 4.1. Obě metody jsou pro stanovení chloramfenikolu přibližně stejně citlivé.

Při cyklické voltametii od 1550 mV do -1770 mV poskytuje chloramfenikol po dvou cyklech dva píky. První je katodický při -780 mV a druhý anodický při 400 mV, který se objevuje ve 2. cyklu. Katodický pík odpovídá redukci nitro skupiny na hydroxylaminovou skupinu a anodický pík odpovídá následné oxidaci hydroxylaminové skupiny na nitroso skupinu.

Na základě sledování spektrofotometrických křivek roztoku chloramfenikolu uchovávaného ve tmě byla ověřena stabilita tohoto roztoku po dobu více než jednoho měsíce.

Tab. 4.1 Srovnání použitých technik a dosažených výsledků pro stanovení CAP na BDDFE.

<i>Elektroda / technika</i>	<i>prostředí</i>	<i>LOD [mol.l⁻¹]</i>
BDDFE / DCV	BR pufr; pH 6	$3 \cdot 10^{-6}$
BDDFE / DPV	BR pufr; pH 6	$3 \cdot 10^{-6}$

5. Literatura

- (1) Chloramphenicol CAS No. 56-75-7 dostupné z URL:
<http://webbook.nist.gov/cgi/cbook.cgi?ID=56-75-7&Units=SI> 20. 4 2009
- (2) Český lékopis 2005. Grada Publishing a.s., Praha (2005)
- (3) H. Pudilová: Stanovení chloramfenikolu na uhlíkových pastových elektrodách. Diplomová práce, UK v Praze, PřF, Praha (2006)
- (4) X. Fei, F. Zhao, J. Li, Y. Rui, B. Zeng: Sensitive voltametric determination of chloramphenicol by using single-wall carbon nanotube-gold nanoparticle ionic liquid composite film modified glassy carbon electrodes. *Analytica Chimica Acta* **596**, 79-85 (2007)
- (5) S. Baron, Medical Mikrobiology. The University of Texas Medical Branch at Galveston, Galveston (1996)
- (6) L. Agüi, A. Guzmán, P. Yañez-Sedeño, J.M. Pingarrón: Voltametric determination of chloramphenicol in milk at electrochemically activated carbon fibre microelectrodes. *Analytica chimica acta* **461**, 65-73 (2002)
- (7) L Wang, H Yang, C Zhang, Y Mo, X Lu: Determination of oxytetracycline, tetracycline and chloramphenicol antibiotics in animal feeds using subcritical water extraction and high performance liquid chromatography. *Analytica Chimica Acta* **619**, 54-58 (2008)
- (8) Léky a jejich použití, The British Medical Association. Gemini Bratislava, str. 268, Praha (1993)
- (9) M. Feng, D. Long, Y. Fang: Parallel incident spectrochemistry study of chloramphenicol. *Analytica Chimica Acta* **363**, 67-73 (1998)
- (10) I. Vovk, B. Simonovska: Development and validation of thin-layer chromatographic method for determinativ chloramphenicol residues on pharmaceutical equipment surface. *Journal of AOAC International* **88**, 1555-1561 (2005)
- (11) S. Wei-Wei, D. Ming-Xing: Immuno-voltametric determinativ of chloramphenicol residues in milk, *Chinese Journal of Analytical Chemistry* **35**, 1731-1735 (2007)
- (12) G. Pajchel, K. Michalska, R. German, S. Tyski: Assay of related compounds thiamphenicol, florphenicol and chloramphenicol by CE. *Chromatographia* **68**, 587-591 (2008)

- (13) J. J. VanDer Lee, W. P. Van Bennekom, H. J. De Jong: Determination of chloramphenicol at ultra-trace levels by high-performance differential pulse polarography Application to Milk and Meat. *Bulletin of the veterinary institute in Pulawy* **52**, 431-434 (2008)
- (14) F. Xiao, F. Zhao, J. Li, R. Yan, J. J. Yu, B. Zeng: Sensitive voltammetric determination of chloramphenicol by using single-wall carbon nanotube-gold nanoparticle-ionic liquid composite film modified glassy carbon electrodes. *Analytica Chimica Acta* **596**, 79- 85 (2007)
- (15) C. Yarnitzky, W. Smyth: Square-wave polarographic and voltammetric analysis of selected electroreducible drugs. *International Journal of Pharmaceutics* **75**, 161 -169 (1991)
- (16) S. Chuanuwatanakul, O. Chailapaku, S. Motomizu: Electrochemical analysis of chloramphenicol using boron-doped diamond electrode applied to a flow-injection system. *Analytical Sciences* **24**, 493-498 (2008)
- (17) J. Barek, J. Fischer, T. Navrátil, K. Pecková, B. Yosypchuk, J. Zima: Nontraditional electrode materials in environmental analysis of biologically active organic compounds. *Electroanalysis* **19**, 2003-2014 (2007)
- (18) J. Barek, K. Jandová, K. Pecková, J. Zima: Voltammetric determination of aminobiphenyls at a boron-doped nanocrystalline diamond film electrode. *Talanta* **74**, 421-426 (2007)
- (19) J. Barek, K. Cizek, J. Zima: Polarographic and voltametric determination of trace amounts of 3-nitrofluoranthene. *Collection of Czechoslovak Chemical Communications* **71**, 1571-1587 (2006)
- (20) K. Cizek, J. Barek, J. Fischer, K. Peckova, J. Zima: Voltammetric determination of 3-nitrofluoranthene and 3-aminofluoranthene at boron doped diamond thin-film electrode, *Electroanalysis* **19**, 1295-1299 (2007)
- (21) R. Zhang, G. D. Jin, D. Chen: Simultaneous electrochemical determination of dopamin, ascorbic acid and uric acid using poly (acid chrome blue K) modified glassy carbon electrode. *Sensor and actuators B- chemical* **138**, 175-181 (2007)
- (22) J. Barek, J. Fischer, T. Navratil, K. Peckova, B. Yosypchuk: Silver solid amalgam electrodes as sensors for chemical carcinogens. *Sensors* **6**, 445-452 (2004)
- (23) C. F. Ding, F. Zhao, R. Ren, J. M. Lin: An electrochemical biosensors for alpha-fotoprotein based on carbon paste electrode constructed of room temperature ionic liquid and gold nanoparticles. *Talanta* **78**, 1148-1154 (2009)
- (24) P. W. May: Diamond thin films: a 21st-century material. *Philosophical Transactions of the Royal Society A* **358**, 473-495 (2000)

- (25) G. M. Swain, R. Ramesham: The electrochemical activity of boron-doped polycrystalline diamond thin-film electrodes, *Analytical Chemistry* **65**, 345-351 (1993)
- (26) S. E. Jones, R. G. Compton: Stripping analysis using boron-doped diamond electrodes. *Current Analytical Chemistry* **4**, 170-176 (2008)
- (27) A. Preechaworapun, S. Chuanuwatanakul, Y. Einaga, S. Motomizu, O. S. Chailapakul: Electroanalysis of sulfonamides by flow injection system/high-performance liquid chromatography coupled with amperometric detection using boron-doped diamond electrode, *Talanta* **68**, 1726–1731 (2006)
- (28) Y. V. Pleskov, A. Y. Sacharova, M. D. Krotova: Photoelectrochemical properties of semiconductor diamond. *Journal of Electroanalytical Chemistry* **228**, 19-27 (1987)
- (29) N. Simon, H. Girard, M. Manesse, D. Ballutaud, A. Etcheberry: Electrochemical preconditioning of moderately boron doped diamond electrodes: Effect of annealing, *Diamond & Related Materials* **17**, 1371–1375 (2008)
- (30) F. P. Ribeiro, A. Cardoso, R. R. Portela, J. E. S. Lima, S. A. S. Machado, P. de Lima-Neto, D. De Souza, A. Correia: Electroanalytical Determination of Promethazine Hydrochloride in Pharmaceutical Formulations on Highly Boron-Doped Diamond Electrodes Using Square-Wave Adsorptive Voltammetry, *Electroanalysis* **20**, 2031 – 2039 (2008)
- (31) E. C. Almeida, M. R. Baldan, J. M. Rosolen, N. G. Ferreira: Impedance characteristics of the diamond/carbon fiber electrodes for electrical double-layer capacitor. *Diamond & Related Materials* **17**, 1529–1533 (2008)
- (32) L. Xiao, I. Streeter, G. G. Wildgoose, R. G. Compton: Fabricating random arrays of boron doped diamond nano-disc electrodes: Towards achieving maximum Faradaic current with minimum capacitive charging. *Sensors and Actuators B* **133**, 118–127 (2008)
- (33) Y. F. Gao, X. H. Chen, S. Gupta: Magnetron sputtered diamond-like carbon microelectrodes for on-chip measurement of quantal catecholamine release from cells, *Biomedical Microdevices* **10**, 623-629 (2008)
- (34) K. Fossdal, E. Jacobsen: Polarographic determination of chloramphenicol, *Analytica Chimica Acta* **56**, 105-115 (1971)
- (35) K. Jandová: Voltametrické stanovení aminobifenylů na diamantových elektrodách. Diplomová práce, UK v Praze, PřF, Praha (2007)
- (36) M. Meloun, J. Militký: Statistické zpracování experimentálních dat na osobním počítači. FINISH, Pardubice 1992